

1  
K

Kokai No.: Hei.10-96  
Kokai Date: January 6, 1998  
Application No.: Hei.8-172806  
Filing Date: June 13, 1996  
Applicant: Nikken Chemicals Co., Ltd.  
Inventors: Saburo Chida  
Toshiro Ochiai  
Title: A method for producing erythritol with a use of  
microorganisms

Claims:

1. A method for producing erythritol comprising cultivating a strain of Trichosporonoides megachiliensis in a culture medium at high saccharide concentration and then recovering the erythritol accumulated in the culture medium.
2. The method according to Claim 1 wherein the saccharide concentration of the culture medium at high saccharide concentration is 20 - 50 w/v %.

(19) 日本国特許庁 ( J P )

(12) 公開特許公報 ( A )

(11) 特許出願公開番号

特開平 1 0 - 9 6

(43) 公開日 平成 1 0 年 ( 1 9 9 8 ) 1 月 6 日

(51) Int. Cl. °	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C12P 7/18			C12P 7/18	
C12N 1/14			C12N 1/14	B
//(C12P 7/18				
C12R 1:645 )				
(C12N 1/14				
審査請求 未請求 請求項の数 2 F D (全 5 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平 8 - 1 7 2 8 0 6  
(22) 出願日 平成 8 年 ( 1 9 9 6 ) 6 月 1 3 日

(71) 出願人 0 0 0 2 2 6 4 0 4  
日研化学株式会社  
東京都中央区築地 5 丁目 4 番 1 4 号  
(72) 発明者 千田 三郎  
埼玉県大宮市北袋町 1 丁目 3 4 6 番地 日  
研化学株式会社大宮研究所内  
(72) 発明者 落合 敏郎  
埼玉県大宮市北袋町 1 丁目 3 4 6 番地 日  
研化学株式会社大宮研究所内

(54) 【発明の名称】 微生物を用いるエリスリトールの製造方法

(57) 【要約】

【目的】 微生物を用いて効率よくエリスリトールを生産する方法を提供する。

【解決手段】 トリコスボロノイデス・メガチリエンシス (Trichosporonoides megachiliensis) に属するエリスリトール生産菌、例えばトリコスボロノイデス・メガチリエンシス CBS 190.92 株、または同 CBS 191.92 株を高濃度、好ましくは 20~50 W/V % の糖 (ブドウ糖、フルクトース、マルトース、蔗糖等) を含む培地で培養し、培地中に蓄積されたエリスリトールを採取する。

【効果】 トリコスボロノイデス属の菌株であるトリコスボロノイデス・メガチリエンシス (Trichosporonoides megachiliensis) を用い、高濃度の糖から多量のエリスリトールを安価に生産することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】トリコスポロノイデス・メガチリエンシス (*Trichosporonoides megachiliensis*) に属する菌株を高濃度の糖培地で培養し、培地中に蓄積されたエリスリトールを採取することを特徴とする、エリスリトールの製造方法。

【請求項 2】高濃度の糖培地が糖濃度 20 ~ 50 W/V % である請求項 1 記載のエリスリトールの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は微生物を用いるエリスリトールの製造方法に関し、更に詳しくはトリコスポロノイデス・メガチリエンシスに属する菌株を用いるエリスリトールの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】現在、エリスリトールを生産するために実用化されている微生物として、モニリエラ・トメントサ・パール・ポリニス (*Moniliella tomentosa* var. *pollinis* CBS 461.67) とオーレオバシデウム (*Aureobasidium* sp. SN-G42 FERM P-8940) の 2 種類が知られている。前者には、糖類の発酵によりポリオールを工業的規模で製造する方法等 (特公平 6-30591、同 6-30592、同 6-30593、同 6-30594) 一連のポリオールの製造方法が知られている。また、後者にはエリスリトール生産能を有する新規微生物及びそれを用いる発酵によるエリスリトールの製造方法 (特公平 4-11189、同 4-635) が知られている。

【0003】一方、トリコスポロノイデス属の微生物については、その種は不明であるがブラジル国カンピナス大学のマリナ・A・アオキ氏等による蔗糖及びブドウ糖からのエリスリトールへの変換の報告 (BIOTECHNOLOGY LETTERS, Volume 15, NO.4, P.383-388, April 1993) がある。この報告によると、ブドウ糖からエリスリトールへの変換率が 43.0%、蔗糖からエリスリトールへの変換率が 37.4% と高いものの、このときの培養液の糖濃度は 10% (W/V) と低く、又、培養日数も 6 日間と長いなど工業的規模での製造には問題がある。本発明で使用するトリコスポロノイデス・メガチリエンシス (*Trichosporonoides megachiliensis*) は、カナダ国アルバータ大学の G. ドグラス・イングリシ (DOUGLAS INGLIS) とリン・シグラー (LYNNE SIGLER) により 1992 年に新菌種として報告 (Mycologia, Volume 84, No. 4, P.555-570, 1992) された菌株である。彼らの報告には新菌種と同定した菌株の形態学的、生理学的諸性状が記述されている。しかし、これらの菌株がエリスリトールを生成するとの報告はない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明者等は微生物を

用いるエリスリトールの製造方法について、種々研究を行った結果、トリコスポロノイデス・メガチリエンシスがブドウ糖等の糖を効率よく高収率でエリスリトールに変換することを見いだし本発明を完成するに至った。したがって、本発明の目的は、トリコスポロノイデスに属する微生物を用いて、高濃度 (20 ~ 50 W/V %) の糖からエリスリトールを製造する方法を提供するにある。

【0005】

10 【課題を解決するための手段】即ち、本発明はトリコスポロノイデス・メガチリエンシス (*Trichosporonoides megachiliensis*) に属する菌株を高濃度の糖培地で培養し、培養物からエリスリトールを採取することを特徴とするエリスリトールの製造方法に関する。

【0006】

【発明の実施の形態】以下に、本発明に係るエリスリトールの製造方法について述べる。本発明で使用するトリコスポロノイデス・メガチリエンシスに属する菌株としてはトリコスポロノイデス・メガチリエンシス CBS 190.92 株 (UAMH 6490 株)、同 CBS 191.92 株 (UAMH 6822 株) の他、カナダ国アルバータ大学の G. ドグラス・イングリシ等により報告された菌株である、トリコスポロノイデス・メガチリエンシス UAMH 6820 株、同 UAMH 6821 株、同 UAMH 6823 株、及びこれらの菌株を通常の変異処理方法、例えば、紫外線照射、放射線照射等による物理的変異方法、あるいはエチルメタンサルホン酸、ニトロソグアニジン等の化学的変異剤による化学的変異方法等で処理することにより得られた変異株を挙げることができる。

30 【0007】菌株の培養は炭素源、窒素源、無機塩類等を含む液体培地を用いて好氣的条件下に行われる。炭素源としてはグルコース、フルクトース、蔗糖、マルトース等の糖類及びこれらの糖類を含む澱粉糖化液、甘藷糖蜜、甜菜糖蜜等の糖質、好ましくは、グルコース、フルクトース又は蔗糖が使用される。窒素源としては微生物により利用可能な窒素化合物、例えば酵母エキス、ペプトン、麦芽エキス、コーンステープリカー、アンモニア水、アンモニウム塩類、尿素、硝酸塩類等が使用される。無機塩としてはリン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、カリウム塩、鉄塩、マンガン塩等が適宜使用される。その他、培養液中の発泡を抑制するため、通常使用されるシリコーン樹脂等の消泡剤が適宜使用される。

40 【0008】培養は、培地中の糖濃度を高濃度、好ましくは 20 ~ 50 W/V %、更に好ましくは 30 ~ 40 W/V % に調製した、前記組成からなる液体培地に菌株を直接植菌するか、又は別に前培養によって得られる種培養液を接種して、以下の条件、即ち、通常 pH 3 ~ 8、好ましくは pH 3 ~ 6、培養温度 24 ~ 40℃、好ましくは 35 ~ 38℃ で通常 3 ~ 8 日間培養することにより

行われる。尚、培養は、培地の栄養源が最大限に利用され、かつ培養液中のエリスリトールの生成量が最高に達した時点で培養を終了させることが望ましい。培養液中に蓄積されたエリスリトールは、常法により培養液から分離し採取される。例えば、培養液から菌体を濾過あるいは遠心分離によって除去し、次いで、イオン交換樹脂処理法、吸着クロマトグラフィー法、溶媒抽出法、濃縮法、晶析法等の方法を適宜組み合わせることにより行われる。更に、不純物を除去するため、通常用いられる活性炭脱色処理法、再結晶法等も用いられる。

【0009】

【実施例】次に、本発明の実施例について具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1 (培養温度とエリスリトール収率)

	CBS190.92	CBS191.92
培養温度 (℃)	エリスリトールの 対糖収率	エリスリトールの 対糖収率
24.5	21.0	17.4
25.5	21.9	16.6
27.0	22.4	21.3
28.5	23.1	21.9
30.1	22.8	22.4
31.5	22.9	24.1
33.2	23.2	24.5
35.0	23.3	27.8
36.5	28.1	28.0
38.0	29.4	28.8
39.7	21.0	17.9

【0011】表 1 に示したように、CBS190.92 株のエリスリトール生産の最適温度範囲は 36.5～38℃であり、このときのエリスリトールの対糖収率は 28.1～29.4%であった。また、菌株 CBS191.92 株のエリスリトール生産の最適温度範囲は 35～38℃であり、このときのエリスリトールの対糖収率は 27.8～28.8%であった。

【0012】実施例 2 (糖の種類の影響)

菌株 (CBS190.92、CBS191.92) を酵母エキス培地を基本培地として、ブドウ糖を他の糖類 (フルクトース、マルトース、蔗糖) に変えて、それぞ

エリスリトール生成量 (g/l)

	CBS190.92	CBS191.92
フルクトース	102.7	93.2
マルトース	37.9	28.4
蔗 糖	134.9	124.4

【0014】表 2 に示したように、本発明ではフルクト

トリコスボロノイデス・メガチリエンシス CBS190.92 株及び同 CBS191.92 株をそれぞれ酵母エキス培地 (ブドウ糖 30W/V%、酵母エキス 1W/V%) に植菌し、35℃、3日間振とう培養した後、予め、同酵母エキス培地を分注しておいた L 型培養管に、培地量の 2% になるように接種し、振とう温度勾配培養装置 (アドバンテック東洋株式会社、モデル TN-2148) を用いて、振とう数 60 回/分、温度 24.5～39.7℃の範囲で 4 日間培養した。培養液中のエリスリトールの対糖収率 (消費された糖量に対する生成されたエリスリトールの収率) は高速液体クロマトグラフで培養液中のブドウ糖の残量とエリスリトールの生成量を測定する事で算出した。その結果を表 1 に示した。

【0010】

【表 1】

れ培養した。即ち、菌株をそれぞれ酵母エキス培地 (ブドウ糖 30W/V%、酵母エキス 1W/V%) に植菌し、35℃、3日間振とう培養して得られた種培養液をそれぞれ、酵母エキス培地を基本にそれぞれの糖を添加した培地 (糖 40W/V%、酵母エキス 1.33W/V%) に接種 (対培地量 2%) し、37℃、7日間、三角フラスコによる振とう培養を行った。その結果を表 2 に示した。

【0013】

【表 2】

ース又は蔗糖を培地の炭素源としたときはブドウ糖と同

様にエリスリトールの生成量が高いことが分かる。

【0015】実施例3 (pHの影響)

トリコスポロノイデス・メガチリエンシス CBS190.92株及び同CBS191.92株をそれぞれ培養し培地pHの検討を行った。即ち、両菌株をそれぞれ酵母エキス培地(ブドウ糖30W/V%、酵母エキス1W/V%)に植菌し、35℃、3日間振とう培養した。続いてそれぞれの菌株を、塩酸及び苛性ソーダを用いて培

地のpHを2.5、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0、10.0に調整した培地(糖40W/V%、酵母エキス1.33W/V%)に接種(対培地量1.0%)し、培養中の培地のpHを初めのpHに保持し、37℃、5日間、三角フラスコによる振とう培養を行った。その結果を表3に示した。

【0016】

【表3】

	CBS190.92	CBS191.92
pH	エリスリトール 対糖収率 (%)	エリスリトール 対糖収率 (%)
2.5	23.6	痕 跡
3.0	28.9	26.0
4.0	26.0	25.0
5.0	27.1	24.6
6.0	26.2	24.7
8.0	27.2	26.5
10.0	0	0

【0017】表3に示したように本発明ではpH3.0から8.0まで幅広い範囲でエリスリトールを安定して製造できることが分かる。

【0018】実施例4 (糖濃度と培養時間)

トリコスポロノイデス・メガチリエンシス CBS190.92株及び同CBS191.92株をそれぞれ酵母エキス培地(ブドウ糖30W/V%、酵母エキス1W/V%)に植菌し、35℃、3日間振とう培養した。続い

て得られた種培養液を、糖濃度を10、20、30、40、50、60W/V%に調製した培地に接種(対培地量2.0%)し、37℃で、それぞれ、エリスリトールの最高収率(対糖収率)が得られる迄三角フラスコによる振とう培養を行った。その結果を表4に示した。

【0019】

【表4】

	CBS190.92		CBS191.92	
ブドウ糖濃度 (W/V%)	培養 日数	エリスリトール 対糖収率 (%)	培養 日数	エリスリトール 対糖収率 (%)
10	2	36.7	2	37.0
20	5	33.2	5	29.3
30	5	30.5	5	28.7
40	6	27.3	6	26.1
50	8	19.0	11	18.3
60	8	7.1	11	5.6

【0020】表4に示したように、ブドウ糖の糖濃度10W/V%ではCBS190.92株及びCBS191.92株共に培養日数は2日間と短時間で終了した。この時のエリスリトールの対糖収率はそれぞれ、36.7%と37.0%であった。また、糖濃度40W/V%においてはCBS190.92株の培養日数は6日間でこの時のエリスリトールの対糖収率は27.3%であった。又、CBS191.92株の培養日数は6日間でこの時のエリスリトールの対糖収率は26.1%であった。

【0021】実施例5

40 菌株(CBS190.92)を酵母エキス培地(ブドウ糖30W/V%、酵母エキス1W/V%)に植菌し、37℃で3日間振とう培養した。次いで、得られた培養液を、前述の酵母エキス培地に植菌(対培地量2.0%)し、ミニジャフアーメンター(エイブル株式会社:モデルDPC-2)で37℃、攪拌数450回/分で5日間培養した。培養終了時のエリスリトールの対糖収率は35.1%であった。

【0022】実施例6

50 実施例4の糖濃度30W/V%の培地で培養した培養液の一部を用いて、エリスリトールの結晶を得て物質の確

認を行った。即ち、培養液から菌体を濾去し上澄液を得た。次いで、この上澄液を活性炭による脱色及びイオン交換樹脂 (SK-1B (三菱化学) : PA-408 (三菱化学)) による脱塩をし、得られた溶出液を糖濃度 50 % 以上に濃縮した後、ゆっくりと冷却しながら結晶を得た。更に、この結晶を水から再結晶して結晶を得た。本物質の赤外線吸収スペクトル、融点及び核磁気共鳴スペクトルをエリスリトールの標準品と比較したところ一致する事から本物質はエリスリトールである事を確認した。

【 0 0 2 3 】

【発明の効果】トリコスボロノイデス・メガチリエンシ

スに属する菌株を用いると、同属の公知菌株 (前記文献に記載の菌株) と比べてエリスリトール生産の培養時間を大巾に短縮する (文献では糖濃度 10 % の場合、培養日数が 6 日間であるのに対して、本発明では 2 日間で培養が終了する) ことができ、しかも両者の収率はほぼ同程度であるため、本発明はエリスリトールを生産する上で非常に有利な方法である。更に、本発明では、糖濃度 30 W/V % と高濃度の培地を用いた場合も、5 日間で培養が終了し、エリスリトールの収率 (対糖収率) が約 35 % と比較的高いため、エリスリトールを生産する上で極めて有利である。

10

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>  
C12R 1:645 )

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所